

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO APLICADAS  
A PRODUTOS NATURAIS**

**MARCO AURÉLIO SAMPAIO PINTO**

Florianópolis, novembro de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO APLICADAS  
A PRODUTOS NATURAIS**

*Trabalho de conclusão no Curso de Química  
do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
da Universidade Federal de Santa Catarina*

*Orientador : Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente*

**MARCO AURÉLIO SAMPAIO PINTO**

Florianópolis, novembro de 2005

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a professora Inês e ao professor Moacir pelo espaço cedido e pelas orientações para que este trabalho pudesse ser realizado;

Agradeço também ao pessoal do LQPN em destaque a Munique;

A todos os meus amigos: do curso, de infância, de longe e de perto;

A Marilda, coordenadora do Linjur, que me ajudou nesses últimos dois anos, e por quem eu tenho um enorme carinho;

A todos os meus familiares, em especial a minha mãe.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PALNTAS</b>	<b>4</b>
3.1. SELEÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS	4
3.2. IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	5
3.3. COLETA DA AMOSTRA	6
3.4. SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL	7
3.5. PROCESSO DE MOAGEM	8
3.6. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	8
3.6.1. OPERAÇÕES EXTRATIVAS	9
3.6.1.1 MACERAÇÃO	10
3.6.1.2 PERCOLAÇÃO	10
3.6.1.3 SOXHELT	10
3.7. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS	11
3.7.1 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	11
3.7.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	13
3.8. REVELAÇÃO DE CROMATOGRAMAS	15
3.9. PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	16
3.9.1 RECRISTALIZAÇÃO	16
3.10. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	16
<b>4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>20</b>
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA	20
4.1.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	21
4.1.3. ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>SCHINUS molle</i>	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>S. molle</i>	24
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>34</b>

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>Pg</b>
<b>Tabela 1:</b> Partes das plantas utilizadas e épocas de colheita	7
<b>Tabela 2:</b> Reativos para a cromatografia em camada delgada	16
<b>Tabela 3:</b> Frações eluídas através de coluna cromatográfica	23
<b>Tabela 4:</b> Reunião das frações obtidas na coluna cromatográfica	24
<b>Tabela 5:</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ para a mistura de ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico comparado com dados da literatura	27
<b>Tabela 6:</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ para a mistura de ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico comparado com dados da literatura	28
<b>Tabela 7:</b> Dados de RMN $^1\text{H}$ para a mistura de ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico comparado com dados da literatura.	29
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ para a mistura de ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico comparado com dados da literatura	30

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Pg</b>
<b>Figura 1:</b> Fluxograma geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas	12
<b>Figura 2:</b> Fluxograma para obtenção de extratos e frações de <i>Schinus molle</i>	22
<b>Figura 3:</b> monitoramento das frações obtidas com os padrões	25
<b>Figura 4:</b> Triterpenos isolados de <i>Schinus molle</i> , ácido isomasticadienónico (1) e ácido masticadienónico (2)	26
<b>Figura 5:</b> Triterpenos isolados de <i>Schinus molle</i> , ácido 3-epi- isomasticadienólico (3) e ácido 3-epi-masticadienólico (4).	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia gasosa
EM	Espectrometria de massas
IV	Infra Vermelho
MHz	Megahertz
R <sub>f</sub>	Índice de retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UV	Ultra Voileta

## RESUMO

Embora muitos compostos derivados de plantas possam ser sintetizados em laboratório, tal síntese é freqüentemente tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção torna-se economicamente inviável.

Por outro lado, alguns compostos também originados de plantas não podem ser ou nunca foram quimicamente sintetizados. Sendo assim, a química dos produtos naturais realiza um papel importante na obtenção e descoberta de compostos que apresentam alguma atividade biológica.

Nesse trabalho, procurou-se descrever as técnicas aplicadas a produtos naturais, desde a etapa inicial, seleção e identificação do material vegetal, pois a falta de identificação científica (ou uma identificação errônea) anulará todo o trabalho do químico, tornando-o impublicável e praticamente inútil, seguindo pela preparação e obtenção de extratos vegetais, que utiliza a maceração e a partição líquido-líquido, fracionamento dos extratos vegetais através de cromatografia de adsorção (cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada) e finalizando na elucidação estrutural do composto isolado, a partir de dados espectroscópicos, tais como IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , e com posterior comparação com dados da literatura, quando estes estão disponíveis.

Utilizando-se essas técnicas, obteve-se a partir o isolamento de duas mistura de quatro triterpenos: ácido isomasticadienónico com o ácido masticadienónico e ácido 3-epi-isomasticadienólico com o ácido 3-epi-masticadienólico, a partir do extrato hexânico da espécie *Schinus molle*.



## 1. INTRODUÇÃO

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos.

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas.

A química de produtos naturais, fitoquímica, tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário das plantas, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares.

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas.

Existe a necessidade de se obter produtos naturais purificados para que se possa efetuar a completa identificação espectroscópica, realizar ensaios biológicos para a obtenção de padrões para a indústria farmacêutica e material de partida para a síntese. A obtenção de produtos puros de um extrato vegetal pode ser um processo longo, caro e necessitar, na maioria dos casos, de várias etapas. Às vezes, pode-se conseguir quantidades ínfimas de um composto desejado e, além disso, ele pode ser instável.

A diversidade de moléculas ativas nas plantas representa um desafio para o químico que pretende isolar e determinar a estrutura de compostos ativos, uma vez que um extrato de uma determinada planta pode conter centenas ou milhares de metabólicos secundários. Desta forma, numerosos métodos de extração e estudo de compostos, oriundos de plantas, têm sido sugeridos pela literatura.

Por isso, é importante que se tenha acesso a diferentes técnicas de extração e isolamento. Hoje em dia, existe a possibilidade de se realizar esquemas rápidos e adequados de separações, por meio de uma escolha sensata de diferentes técnicas disponíveis.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por finalidade a aplicação de técnicas de separação e identificação, de metabólitos secundários, usadas rotineiramente em laboratório de produtos naturais de origem vegetal.

Especificamente têm-se os seguintes objetivos:

- 1) Pesquisa bibliográfica envolvendo métodos de separação e identificação de compostos.
- 2) Obtenção dos extratos das folhas e galhos de *S. molle* por maceração em hexano e etanol.
- 3) Particionamento líquido-líquido do extrato etanólico com acetato de etila.
- 4) Fracionamento por cromatografia em coluna do extrato hexânico
- 6) Análise espectroscópica através de infravermelho e ressonância magnética nuclear das frações purificadas.

### 3. PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS

Uma planta pode conter milhares de diferentes metabólitos secundários, os estudos fitoquímicos podem nos dar uma idéia desta complexa mistura.<sup>1</sup> Apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica.<sup>2</sup> O reino vegetal representa, desta forma, um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas.<sup>2,3</sup>

A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso a necessidade de um trabalho em colaboração mais ampla entre químicos e farmacólogos para a análise de extratos, onde se obtém extratos semipuros, frações e finalmente compostos puros. Desta forma, para se obter substâncias puras dotadas de efeitos biológicos, são requeridos além da dedicação e da determinação dos pesquisadores, uma ampla colaboração multidisciplinar.<sup>2,3</sup>

#### 3.1. SELEÇÃO DAS ESPÉCIES VEGETAIS

Em uma investigação fitoquímica objetivando isolar os princípios ativos de uma planta, o primeiro passo é a escolha do material vegetal.<sup>4</sup>

Embora pareça, inicialmente, uma etapa simples, o processo de seleção é certamente de extrema importância para o sucesso do estudo das plantas na presença de alguma atividade biológica.<sup>3</sup> Várias abordagens para a seleção de espécies vegetais têm sido apresentadas na literatura, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica – escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica – seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico.

Em geral a escolha de uma determinada planta é feita através da abordagem etnofarmacológica. Uma vez definida a espécie vegetal a ser estudada, define-se também o local da coleta (origem da espécie vegetal colida). Nesta fase inicial do trabalho científico, o pesquisador deve estar completamente inteirado da literatura sobre a planta escolhida, porque muitas vezes, plantas medicinais são investigadas parcialmente, validando, portanto, o interesse em novas investigações científicas. Por exemplo: a) se a espécie escolhida é encontrada em regiões diferentes no país, torna-se importante avaliar as modificações químicas que possam ocorrer em decorrência de fatores ambientais variáveis <sup>5</sup> b) se a espécie vegetal medicinal estudada sofreu apenas investigação fitoquímica, deixando de lado a abordagem farmacológica, são válidos estudos que interliguem áreas multidisciplinares como etnobotânica, química e farmacologia,<sup>5,6</sup> buscando resultados que possam validar ou não o uso da planta medicinal. Em quaisquer circunstâncias, a pesquisa bibliográfica da planta alvo deve ser realizada obedecendo-se os seguintes fatores: família, gênero e classes de substâncias predominantes.

As probabilidades de novas descobertas de substâncias inéditas, bioativas ou não, é, sem dúvida, maior na seleção randômica. <sup>5</sup>

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular.<sup>6</sup> Já é do conhecimento que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular, que em plantas escolhidas ao acaso.<sup>3</sup>

### 3.2.IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A planta escolhida deve ser seguramente identificada. Para atender esta exigência, depende-se de outro especialista: um botânico ou um técnico especializado. A falta de identificação científica (ou uma identificação errônea) anulará todo o trabalho do químico, tornando-o impublicável e praticamente inútil.<sup>5,7</sup>

A identificação pode ser feita com a planta recentemente coletada ou com a exsicata já preparada. É aconselhável a presença de flores e/ou frutos; a falta dessas estruturas pode induzir ao erro ou dificultar extremamente o trabalho do botânico.<sup>4</sup>

Com a escolha da planta definida e o local de coleta estabelecido, o levantamento bibliográfico efetuado e o projeto de pesquisa elaborado, parte-se então, para a coleta da planta.<sup>5</sup>

A preparação das exsicatas inicia com a coleta. Coleta-se pequenos ramos com folhas, flores e frutos em vários estágios de desenvolvimento. As amostras devem ser representativas do aspecto geral da planta, de modo que ramos com danos, devem ser evitados, porém, se as amostras representativas estiverem com estes danos, devem ser coletadas assim mesmo, pois a representatividade é fator prioritário.

Concluída esta etapa inicial do trabalho, deve-se providenciar o seguinte registro de informações: 1) nome científico e família botânica; 2) nome de quem identificou a espécie; 3) número de registro da exsicata; 4) local do herbário; 5) local e data da coleta; 6) nome popular da planta; 7) anotar a parte da planta utilizada na medicina popular e suas indicações terapêuticas; 8) anotar o tipo de solo onde a planta foi coletada, tipo de vegetação local, tipo de planta (arbusto ou árvore), horário de abertura floral (no caso de conter flores), época de frutificação (no caso de conter frutos), cor e cheiro de várias partes da planta. Quando possível, deve ser tirada uma ou mais fotos da planta inteira no seu habitat natural.<sup>4,5</sup>

### 3.3.COLETA DA AMOSTRA

A primeira etapa da investigação fitoquímica é a coleta do material vegetal. A coleta é o processo de se retirar uma ou mais plantas inteiras ou parte delas da natureza. Mesmo que o objetivo da coleta seja a obtenção de um extrato vegetal para um estudo fitoquímico ou para a obtenção ou de substâncias ativas, é obrigatória a preparação de exsicata.<sup>4</sup>

Na etapa que determina o estudo fitoquímico, escolhe-se parte da planta que será investigada e a quantidade de material coletado. Coleta-se no mínimo 2 kg de material vegetal fresco; no entanto, havendo boas condições de trabalho no laboratório, deve-se coletar entre 3-6 kg de material vegetal, buscando com isso, o isolamento em grandes quantidades de substâncias majoritárias, possibilitando suas avaliações farmacológicas. Durante a coleta, os seguintes itens devem ser cuidadosamente

monitorados: separação e etiquetação do material coletado; embalagem em sacos plásticos; transporte do material; pesagem do material úmido; secagem do material; pesagem do material seco; armazenagem; moagem; pesagem do material triturado; obtenção de extratos.<sup>5</sup>

Em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano. O conhecimento do momento correto de coleta do material desejado leva à obtenção de produtos de melhor qualidade (Tabela1)<sup>4</sup>.

**Tabela 1:** Partes das plantas utilizadas e épocas de colheita

<b>Parte utilizada</b>	<b>Quando colher</b>
Folhas e plantas inteiras	Pré-floração
Flores	Bem abertas
Frutos	Bem maduros
Sementes	Bem desenvolvidas
Cascas e raízes	Outono e início de inverno

### 3.4.SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL

A partir do momento da colheita inicia-se um processo de degradação enzimática na planta, que leva também à degradação dos princípios ativos. O menor período de tempo entre a colheita e a secagem é crucial para a manutenção da integridade máxima dos princípios ativos.

A incidência de raios solares sobre o material colhido também acelera a degradação de substâncias das plantas. A secagem ao sol, além de promover a degradação de princípios ativos, acaba por gerar uma secagem rápida das bordas dos órgãos vegetais e a criação de uma crosta relativamente impermeável à água nessas regiões. O material, em pouco tempo, se apresenta aparentemente seco. No entanto seu interior permanece úmido. A secagem deve, portanto, ser procedida ao abrigo de luz, em secadores que promovam ambiente limpo, bem ventilado e protegido do ataque de insetos e outros animais. A geração de um aumento artificial de temperatura é de

extrema importância. Para a secagem de folhas e flores a temperatura deve estar em torno de 38°C. Para cascas e raízes, temperaturas de até 60° C são aceitáveis. Temperaturas acima desses limites aceleram o processo de secagem, promovendo a degradação de muitos princípios ativos. O período de armazenamento deve ser o menor possível, pois com o passar do tempo podem ocorrer perdas qualitativas e/ou quantitativas nas substâncias ativas da planta.

A secagem das plantas deve ser individual, para não haver mistura de elementos voláteis. A separação das partes das plantas mais úmidas – como ramos – de partes mais secas – como folhas – deve ser feita para que o material esteja pronto no mesmo tempo de secagem.<sup>4</sup>

Caso haja interesse no óleo essencial, deve-se evitar a secagem.<sup>5</sup>

### 3.5. PROCESSO DE MOAGEM

A moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa, a extração.

Geralmente, o corte ou moagem grosseira assumem um caráter preliminar, deixando-se a redução mais fina do tamanho de partícula para uma etapa seguinte. Para fins de armazenagem, por exemplo, é usual que a planta inteira, partes aéreas, raízes, folhas e caule sejam reduzidos a um tamanho de partícula grosseira. A redução definitiva somente ocorrerá no momento prévio às fases de extração ou de mistura. No caso de sementes e outros farmacógenos ricos em óleos essenciais, recomenda-se que os mesmos sejam armazenados intactos ou na forma mais intacta possível, procedendo à moagem em momento imediatamente anterior à extração.<sup>4</sup>

### 3.6. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida na etapa de isolamento e purificação dos constituintes químicos fixos das plantas.<sup>7</sup>

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo

escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, muito freqüentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Por isso, deve-se primeiramente definir, com a maior precisão possível, o que se deseja obter. De acordo com essa definição e levando-se em consideração os fatores envolvidos no processo extrativo, pode-se escolher o método e o solvente que serão empregados.<sup>4</sup>

### 3.6.1. OPERAÇÕES EXTRATIVAS

O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida em um material vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros.

Uma das formas mais aceitas de classificar as operações de extração é segundo a sua eficiência, permitindo reconhecer dois tipos: operações de extração parcial (extração sem esgotamento) e operações de extração exaustiva, que permitem o esgotamento da matéria-prima.

Apesar da ampla variedade de solventes conhecidos (líquidos extratores), são poucos os utilizados na extração dos compostos vegetais. Essa limitação de uso é devida a três aspectos principais: propriedades extrativas, adequação tecnológica, inocuidade fisiológica e fatores econômicos.

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescentes, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridades também crescente.



As operações extrativas geralmente mais utilizadas são: a maceração, percolação e soxhelt, obtendo-se assim os chamados extratos brutos vegetais.<sup>4</sup>

#### 3.6.1.1 MACERAÇÃO

Operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não reduz ao esgotamento a matéria-prima vegetal, seja devido a saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula.

Deve-se evitar o emprego de água ou de misturas hidroalcólicas com concentrações etanólicas inferiores a 20%, dadas às circunstâncias favoráveis à proliferação microbiana.<sup>4</sup>

#### 3.6.1.2 PERCOLAÇÃO

Esta extração tem como característica comum a extração exaustiva das substâncias ativas. Na percolação, o material vegetal moído é colocado em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é passado o líquido extrator.

Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias, farmacologicamente muito ativas, presente em pequenas quantidades ou pouco solúveis e quando o preço da substância ativa a ser extraída é relevante.<sup>4</sup>

#### 3.6.1.3 SOXHELT

É utilizada, sobre tudo, para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho Soxhelt. A extração por Soxhelt, em nível laboratorial, também não deixa de ser um tipo de percolação cíclica, com destilação simultânea e

reaproveitamento do solvente. Essa técnica tem a desvantagem de usar a temperatura.<sup>4</sup>

### 3.7. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS

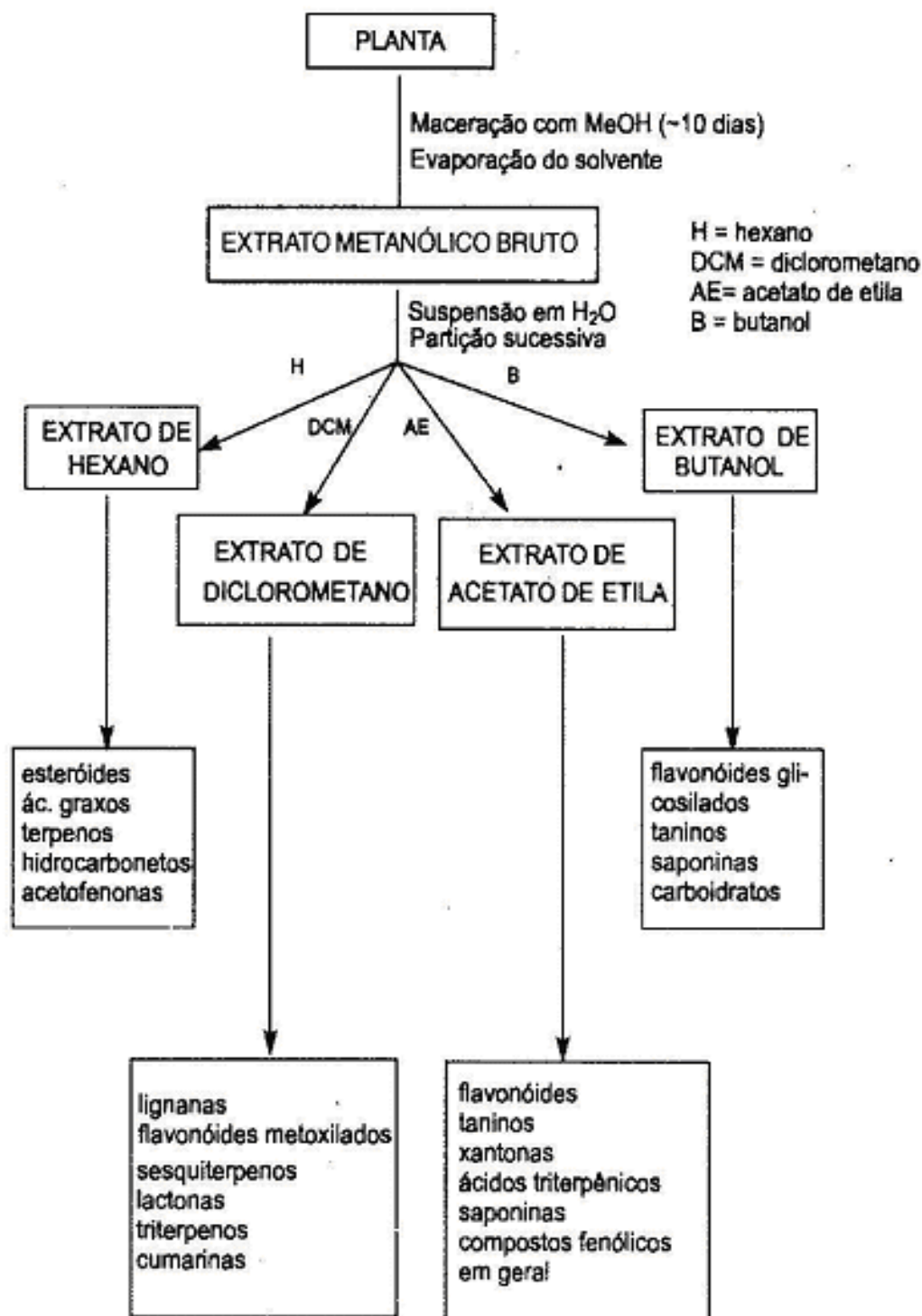
Depois de finalizada a etapa de extração, o passo seqüencial é uma semipurificação do extrato bruto obtido, que pode ser realizado utilizando-se uma partição líquido-líquido e/ou métodos cromatográficos.<sup>8</sup>

#### 3.7.1 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações.<sup>9</sup>

Uma vez que se obteve o extrato, os métodos de partição entre solventes eliminam uma grande parte do material indesejado. Quando se utiliza esse método combinado com testes biológicos obtêm-se, rapidamente, frações enriquecidas com a substância desejada.<sup>1</sup>

Considerando que o extrato em estudo apresenta efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de investigação. Este extrato pode ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, visando uma separação (semipurificação) das substâncias através de suas polaridades. A figura 1 ilustra os procedimentos mencionados, indicando as prováveis classes de compostos que podem ser separados.<sup>3</sup>



**Figura 1:** Fluxograma geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.<sup>4</sup>

### 3.7.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

O método cromatográfico distingue-se entre os diversos métodos de separação e de análise como um dos mais frutíferos em resultados satisfatórios e mais rico em número de variadas técnicas. Como processo de análise imediata, tem permitido o fracionamento de misturas em seus componentes, com maior precisão e com menor consumo de tempo e trabalho, à medida que vêm sendo desenvolvidos novas matérias e novas técnicas.

Em sua expressão mais simples, podemos definir a cromatografia como um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico.<sup>7</sup>

Em todo trabalho investigativo sobre produtos naturais é preciso extrair cuidadosamente os componentes vegetais em estudo para em seguida analisar e purificar os componentes presentes nas extrações obtidas. Logo, esses componentes puros devem ser analisados por técnicas espectroscópicas e métodos químicos, permitindo obter as estruturas químicas correspondentes.

Para que a extração seja completa deve-se usar solventes de polaridade muito distinta. Assim que se escolhe um método separativo adequado, usando-se adsorventes e eluentes apropriados não será difícil obter compostos puros.<sup>10</sup>

Os extratos obtidos na partição líquido-líquido, deverão ser submetidos a diferentes técnicas cromatográficas.<sup>3</sup>

A Cromatografia em Coluna (CC), uma das técnicas mais utilizadas, é um processo de separação entre duas fases, uma sólida uma líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade, onde o equilíbrio dinâmico é estabelecido entre a concentração do soluto em duas fases.<sup>11</sup>

Em geral, é inicialmente empregada a cromatografia em coluna aberta (CC), com sílica gel como fase estacionária que, dependendo do extrato, é eluída com uma mistura de solventes que deve ser previamente determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). Outros suportes cromatográficos podem ser usados, como alumina, celulose, poliamida e sephadex. A CC, usando coluna aberta, consiste no

método cromatográfico mais utilizado, devido sua rapidez, simplicidade, eficiência e baixo custo.

As frações obtidas devem ser reunidas segundo seu perfil cromatográfico, verificado por CCD. Em muitos casos, se obtêm compostos puros usando somente uma CC ou utilizando a cromatografia “flash”. Este tipo de cromatografia, similar à CC comum, permite separar composto com  $R_f$  muito próximos, uma vez que é empregada a mesma sílica, de granulometria fina, usada na CCD, porém com o auxílio de uma bomba de pressão.

Dependendo da quantidade e da natureza do composto isolado, uma simples recristalização com solvente adequado pode levar à purificação do composto ativo. As frações reunidas (subfrações), se não estiverem puras ou não conseguir purificar, devem ser submetidas à análise biológica para a localização dos componentes ativos e, após esta etapa, a subfração de interesse deve ser novamente submetida à CC. Embora as vantagens do uso da CC ou “flash” sejam evidentes, também apresentam algumas desvantagens, como a adsorção irreversível de alguns compostos na fase estacionária empregada, e a possibilidade de degradação de substâncias pouco estáveis.

Dependendo da complexidade da mistura, outras técnicas cromatográficas podem ser mais adequada como:

a) cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP): técnica eficiente em muitos casos em que os componentes da mistura possuem  $R_f$  muito próximos e que sejam visíveis sob ação da lâmpada de UV, sendo um método prático, rápido e de baixo custo. As desvantagens são as perdas de rendimento inerentes à interação dos compostos com a fase estacionária, possibilidade de se obter compostos impuros durante a “retirada” dos compostos de interesse, e capacidade de separar somente poucas quantidades de amostras.<sup>3</sup>

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é mais rápida e geralmente mais aplicável que outras técnicas cromatográficas líquidas e, assim, é largamente usada como um auxílio para seguir uma síntese de laboratório, estabelecer evidências presumíveis de pureza, etc, exatamente como na cromatografia gasosa (CG).<sup>12</sup>

A cromatografia gasosa, atualmente é, uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para a separação e quantificação de produtos diversos, podendo também ser usada como técnica de identificação, em casos especiais.<sup>13</sup>

Na Cromatografia Gasosa (CG), a amostra é vaporizada e injetada numa coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel. Ao contrário, da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito. Sua única função é transportar o analito através da coluna.<sup>11</sup>

Consiste em uma ferramenta extremamente importante para a identificação rápida e eficiente de misturas de compostos com peso molecular menor que 500 e que não apresentam grupos carboxílicos, grupos hidroxila ou grupo amino (que podem ser retidos na coluna cromatográfica). Esta técnica permite que seja acoplado um espectrômetro de massas (CG/EM), onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada.<sup>3</sup>

### 3.8. REVELAÇÃO DE CROMATOGRAMAS

Esta ultima etapa consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. Muitos compostos podem ser visualizados através de luz ultravioleta, por se tornarem fluorescentes quando excitados por essas radiações (em geral nos comprimentos de onda de 254 a 366nm). Quando as substâncias não são fluorescentes pode-se utilizar adsorventes impregnados com reagentes fluorescentes e neste caso observamos manchas escuras contra fundo claro. Existem várias lâmpadas ultravioletas portáteis que emitem radiações a 254 e 366nm, combinadas no mesmo equipamento ou isoladas.<sup>13</sup>

Alguns reveladores utilizados na análise cromatográfica, estão listados na tabela 2.<sup>14</sup>

**Tabela 2:** Reativos para a cromatografia em camada delgada.

<b>Reveladores</b>	<b>Detecção</b>
Anesaldeído sulfúrico	Esteróides, terpenóides, etc
Vanilina sulfúrica	Esteróides, terpenóides, flavonóides
Sulfato de cério (IV)	Triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos
Cloreto férrico	Fenóis e flavonóides
Cloreto de alumínio	Flavonóides
Acido p-toluenosulfônico	Catequinas, esteróides, etc
Tiocinonato de cobalto (II)	Alcalóides e aminas
Reagente de Dragendorff	Alcalóides
Hidróxido de potássio em 10% etanol	Cumarinas, antronas, antraquinona
Acido sulfúrico	Reativo universal
Permanganato de potássio + água	Reativo universal
Cuba de iodo	Sistema pi

### 3.9. PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

#### 3.9.1 RECRISTALIZAÇÃO

O solvente usado na recristalização deve proporcionar uma fácil dissolução da substância a altas temperaturas e pouca solubilidade da substância a baixas temperaturas. A técnica de recristalização baseia-se na diferença de solubilidade que pode existir entre um composto cristalino e as impurezas presentes no produto da reação.<sup>15</sup>

Durante o processo de recristalização, o resfriamento, deve ser feito lentamente para que se permita a disposição das moléculas em retículos cristalinos, com formação de cristais grandes e puros.<sup>4</sup>

#### 3.10. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder à elucidação estrutural dos mesmos, principalmente através do uso de dados espectroscópicos ou espectrométricos. O uso de técnicas espectrais em conjunto, como UV, IV, RMN <sup>1</sup>H e

$^{13}\text{C}$  e EM aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais complexas.<sup>3,16</sup>

Na determinação estrutural, o espectro de absorção de uma substância no UV, uma vez determinado o esqueleto carbonado e o tipo de composto, indica a presença de certos grupos funcionais, bem como a posição dos substituintes no esqueleto da molécula. Assim, por exemplo, os espectros UV de flavonóides proporcionam informações sobre a presença e a posição de grupamentos hidroxila no sistema de anéis, ao mesmo tempo em que possibilitam a diferenciação entre os vários tipos de flavonóides.<sup>4</sup>

O espectro infravermelho (IV) mostra um rico agregado de bandas de absorção situadas nas regiões de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>16</sup> O IV de uma substância orgânica corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida à radiação infravermelha e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. A energia seletivamente absorvida da radiação IV provoca alterações transitórias nas ligações interatômicas, que podem sofrer estiramentos ou deformações nos ângulos de ligação. As frequências em que ocorrem as vibrações dependem da natureza das ligações em particular, mas são também afetadas pela vizinhança química e pela molécula como um todo. A presença de insaturações (conjugadas ou não), sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos pode ser verificada através da presença de bandas características, que têm grande importância na análise estrutural. Se o espectro IV de uma substância desconhecida é superponível com o espectro de IV de uma amostra autêntica conhecida, isso pode servir como uma prova de identidade, que é muitas vezes preconizada para a identificação de fármacos pelas farmacopéias.

O espectro de massas (EM) de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a sua estrutura como a massa molecular e padrões de fragmentação. O peso molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença, bem como a localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais.

A espectroscopia de ressonância magnética (RMN) é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o



estabelecimento do esqueleto da molécula.<sup>4</sup> Este sistema permite a análise de pequenas quantidades de compostos puros, com grande precisão em escala de miligramas ou microgramas.<sup>16</sup>

O espectro de próton fornece os deslocamentos químicos dos vários tipos de prótons presentes na molécula, o número de cada tipo de próton (integração) e as constantes de acoplamento (J) com os prótons que ficam sobre carbonos adjacentes.<sup>16</sup>

Em alguns casos, a integração permite determinar a percentagem de cada componente em uma mistura simples. Irradiando seletivamente a frequência de ressonância de um próton (dupla ressonância), seus acoplamentos podem ser eliminados e o resultado é uma simplificação dos sinais dos prótons próximos ao próton irradiado.

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C fornecem os deslocamentos químicos dos vários tipos de carbonos presentes na molécula. Estes estão distribuídos em um campo de 0-220 ppm, muito mais amplo do que os prótons (0-16 ppm), permitindo uma melhor visualização dos tipos de carbonos.<sup>16</sup>

A grande variedade de técnicas disponíveis de RMN permite identificar a proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos em particular, auxiliando dessa maneira, na montagem do *quebra-cabeça* constituído pelas diferentes partes da molécula.

As amostras sólidas destinadas a obtenção de seus espectros devem seguir certos requisitos para a análise espectroscópicas:

i) Pureza: a pureza do material deverá ser a maior possível, avaliada através da determinação do ponto de fusão e do comportamento da substância em cromatografia de camada delgada. Para que a amostra seja considerada suficientemente pura pelo exame cromatográfico em camada delgada, deve mostrar a formação de apenas uma mancha, quando submetida ao desenvolvimento pelo menos em três sistemas de diferentes eluentes.

ii) Umidade: a presença de água no material pode provocar alterações desvantajosas nos espectros de uma substância. Faz-se, então, necessária sua retirada completa das amostras. Isto se pode conseguir de maneira simples, por aquecimento do material em estufa cuja temperatura seja regulada para 5-10°C abaixo

do ponto de fusão da substância, deixando-se, em seguida, o material esfriar dentro do dessecador a vácuo, sobre sílica-gel desidratante, bem azul.

iii) Solubilidade: necessária antes da obtenção do espectro de RMN. Devem ser testados vários solventes de modo a se obter 1-2 mL de solução decimolar, ou normalmente concentração de 30 mg em 1 mL.

iv) Quantidades: as amostras destinadas a obtenção de espectros devem ser encaminhadas ao laboratório de espectrometria separadamente em quantidades adequadas e acondicionadas em pequenos frascos. De modo geral, são necessárias porções de 1-2 mg para os espectros de UV, IV e EM e cerca de 30 mg são necessárias para obtenção de espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .<sup>7</sup>

## 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1.MATERIAL E MÉTODOS

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em aparelho Bruker AC a 200 MHz.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 da Microquímica.

Para os fracionamentos e separações cromatográficas em coluna, foi utilizado sílica gel de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) da Merck. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foi usado sílica gel 60 GF Merck.

Os compostos nas placas cromatográficas foram revelados sob lâmpada de ultravioleta a 254 e 354 nm e por mergulho das placas em solução de sulfato de cério 2N em ácido sulfúrico e anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento da placa.

Os solventes utilizados para separações em coluna de sílica gel, em camada delgada e partições líquido/líquido são todos P.A. sem passar por processos de purificação ou secagem. Os solventes foram evaporados em evaporador rotatório da Quimis à pressão reduzida e temperatura controlada.

As frações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica e os produtos analisados e caracterizados por espectroscopia de IV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ .

Os procedimentos para as técnicas de separação foram feitos conforme a literatura e, sempre que necessário, foram adaptados às condições que o nosso laboratório oferece.

#### 4.1.1.COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

A espécie *Schinus molle* foi coletada no bairro Santa Mônica em Florianópolis, em Janeiro de 2005, sendo identificada no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, pelo professor Daniel de Barcellos Falkenberg.

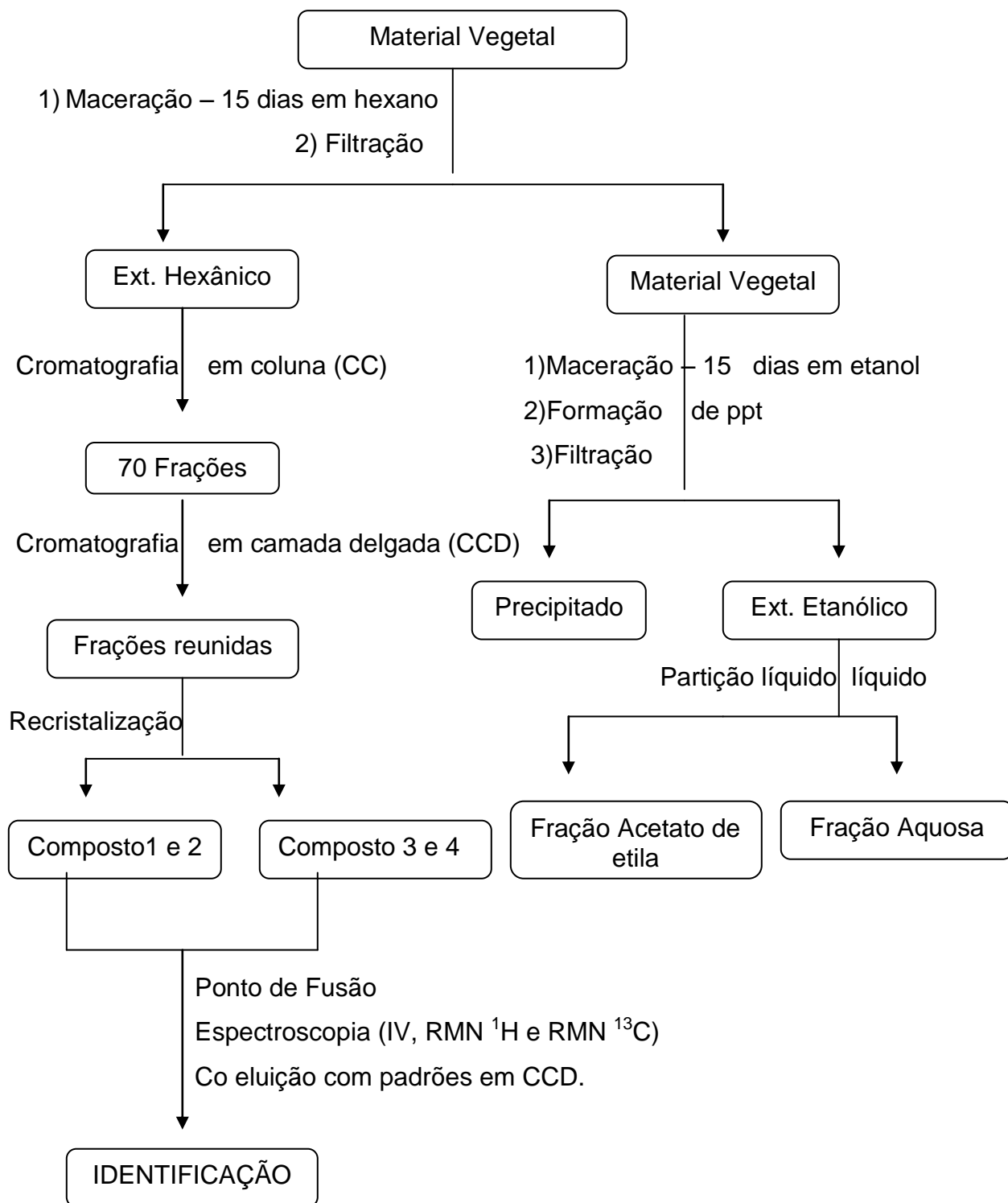
#### 4.1.2.OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Após a coleta, as folhas e os galhos do material vegetal (390 g), foram secos em estufa e em seguida triturados. Deixou-se em maceração por 15 dias com hexano. Logo após, o extrato hexânico, foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida (temperatura aproximada de 60°). A maceração foi repetida três vezes. Obteve-se cerca de 17,8 g de extrato hexânico seco (rendimento 4,6%). O material vegetal resultante foi macerado com etanol e após 15 dias foi filtrado e concentrado. Neste estágio, observou-se a formação de um precipitado que foi separado por filtração. O filtrado foi concentrado rendendo o extrato etanólico (14,8g). O extrato etanólico foi suspenso com EtOH/ H<sub>2</sub>O 20% e posteriormente particionado com acetato de etila fornecendo as frações, acetato de etila (9,5 g) e a fração aquosa (6,2 g), que após secar renderam 2,4 g e 1,6 g por 100 g de material vegetal seco, respectivamente (Figura 2).

#### 4.1.3. ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *SCHINUS molle*

Para a cromatografia em coluna fez-se uma pastilha, na proporção 1:2 que consistiu na mistura do extrato vegetal em estudo com a sílica gel Utilizou-se uma coluna de vidro de 30 cm, com 2/3 de sílica gel e 1/3 de pastilha aproximadamente. A eluição da coluna foi realizada segundo uma ordem crescente de polaridade de acordo com o sistema hexano/acetato de etila, conforme a Tabela 3.

Foram coletadas 70 frações de 200 mL e concentradas por meio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida, e, por fim, transferidas para frascos menores, sendo posteriormente analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas, segundo semelhança de seu perfil cromatográfico. Algumas destas frações foram purificadas através de recristalização.



**Figura 2:** Fluxograma para obtenção de extratos e frações de *Schinus molle*.

**Tabela 3:** Frações eluídas através de coluna cromatográfica.

Hexano ( % )	Acetato de etila ( % )	Frações Recolhidas
100	-	1 - 8
99	1	9 – 13
98	2	14 – 19
97	3	20 – 26
96	4	27 – 31
94	6	32 – 37
92	8	38 – 43
90	10	44 – 46
85	15	47 – 49
75	25	50 – 53
70	30	54 – 59
50	50	60 – 69
-	100	70

O monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado em placas prontas de alumínio, utilizando como fase móvel o sistema hexano/acetato de etila (80:20).

As frações que apresentaram precipitados foram tratadas a fim de isolar possíveis compostos ativos. Estes foram estudados através da análise conjunta de dados espectroscópicos, tais como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e por comparação com os dados da literatura, quando possíveis.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material vegetal seco, *Schinus molle* constituído por folhas e galhos, rendeu 4,6 g de extrato hexânico e 8,4 g de extrato etanólico por 100 g de material vegetal.

Analizou-se cromatograficamente apenas o extrato hexânico de *Schinus molle*, à procura de triterpenos para posterior modificação estrutural em trabalhos futuros.

#### 5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE *S. molle*

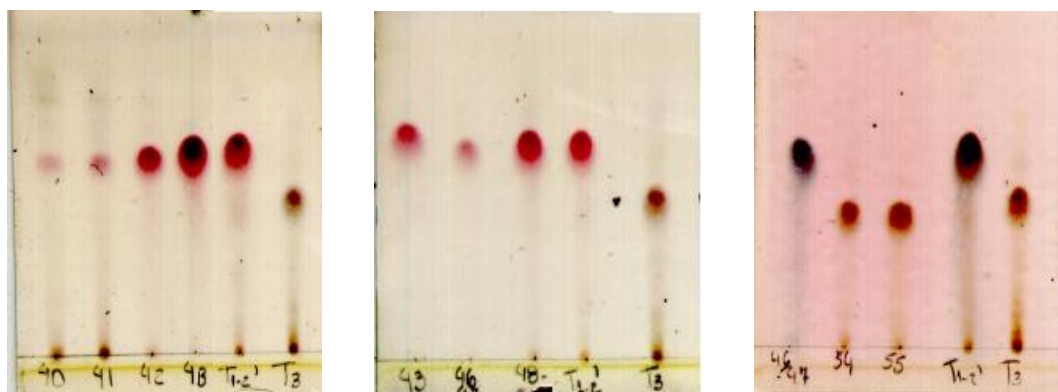
O fracionamento cromatográfico através de cromatografia em coluna do extrato hexânico de *Schinus molle*, resultou em 70 frações eluídas com o sistema de solventes hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade, (Figura 2 pg 22). Estas frações primeiramente foram recristalizadas com solventes apropriados e seus pontos de fusão determinados. Em seguida, as frações cromatográficas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada e reunidas conforme a semelhança de seu perfil cromatográfico (Tabela 4). As frações foram reveladas com anisaldeído sulfúrico, apropriado para revelar triterpenos, o qual mostrou que as frações 42 a 48, 54 e 55 eram triterpenos.

**Tabela 4:** Reunião das frações obtidas na coluna cromatográfica.

Frações Reunidas	p.f. (°C)
6 – 17	72 – 73
25 – 31	72 – 76
34 – 36	76 – 79
37 – 39	73 – 80
42 – 48	150 – 157
54 – 55	167 – 177
57 – 63	173 – 182
65 – 70	180 – 186

As primeiras frações, de 6 a 39, através de análises de seus espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H, mostrou tratar-se de uma mistura de álcoois, ésteres e ácidos carboxílicos de cadeia longa (Os espectros de infravermelho das frações 17, 29 – 31, 34 – 36 e 39 e o espectro RMN <sup>1</sup>H da fração 34 – 36 encontram-se em anexo, Anexo 1a 5).

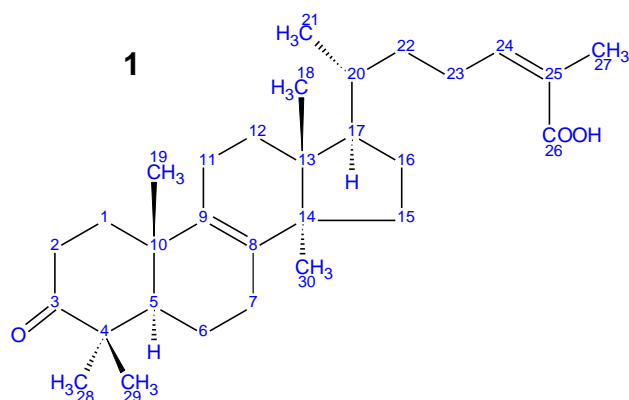
A fração obtida da reunião das frações 42 – 48 que se apresentou na forma de um sólido branco, foi suspensa em metanol e filtrada para uma pré-lavagem do material sólido. Em seguida o sólido obtido foi redissolvido em acetona e deixado recristalizar. Posteriormente monitorou-se novamente essa fração por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase móvel hexano/acetato (80:20) e anisaldeído como revelador, comparando com os padrões;  $T_{1-2}$  (ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico) e  $T_3$  (ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico) (Figura 3). Na reunião das frações 54 e 55, seguiu-se novamente a mesma seqüência feita anteriormente.



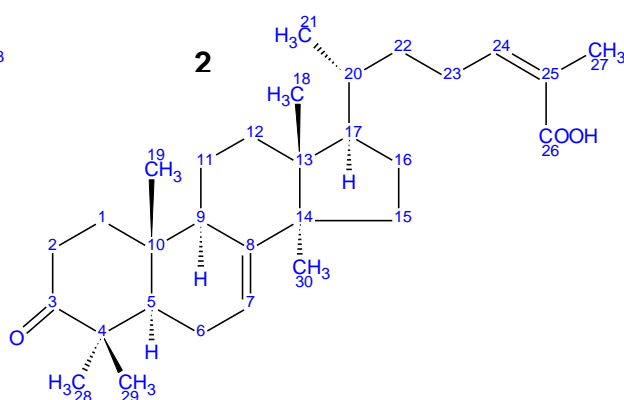
**Figura 3:** monitoramento das frações obtidas com os padrões.

Pela análise através de CCD, observou-se o  $R_f$  de 0,55 e 0,40 para os triterpenos ácidos,  $T_{1-2}$  e  $T_3$  respectivamente, que por se tratar de isômeros (Figura 4 e 5), não foi possível diferenciá-los por CCD. As frações 40, 41, 42 e 48 apresentaram o mesmo  $R_f$  de 0,55, semelhante ao padrão ( $T_{1-2}$ ), porém, as frações 40 e 41 diferiram das demais na semelhança cromatográfica. As frações 54 e 55 apresentaram o mesmo  $R_f$  de 0,40, semelhante ao padrão ( $T_3$ ), e semelhança cromatográfica.



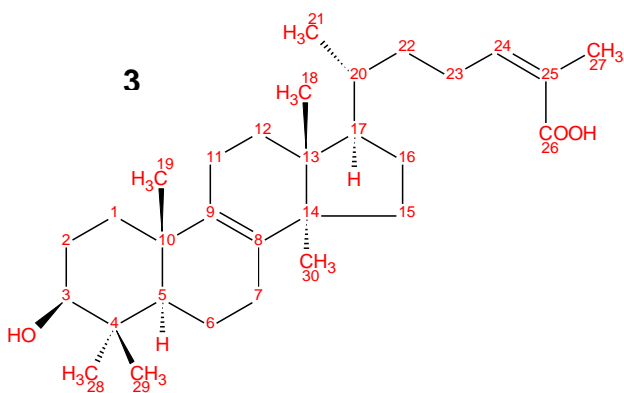


ácido 3-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-óico

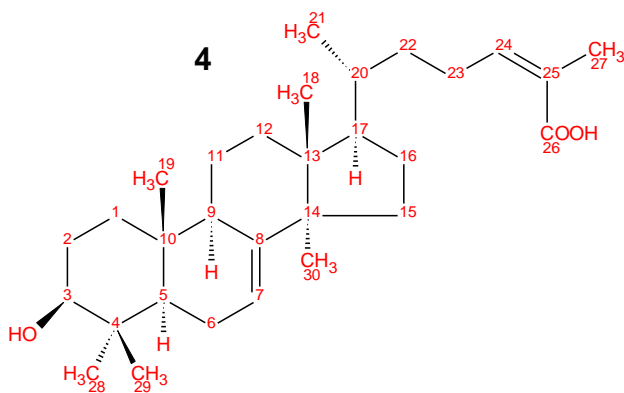


ácido 3-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-óico

**Figura 4:** Triterpenos isolados de *Schinus molle*, ácido isomasticadienónico (1) e ácido masticadienónico (2).



ácido 3 $\alpha$ -hidroxilanosta-8,24Z-dien-26-óico



ácido 3 $\alpha$ -hidroxilanosta-7,24Z-dien-26-óico

**Figura 5:** Triterpenos isolados de *Schinus molle*, ácido 3-epi-isomasticadienónico (3) e ácido 3-epi-masticadienónico (4).

Após recristalização a fração 42 – 48 apresentou-se na forma de cristais brancos e com ponto de fusão de 150 a 157 °C. A análise do espectro de infravermelho mostrou uma absorção em 2952,52 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da ligação C-H. A banda de absorção em 1678,24 cm<sup>-1</sup> indica a presença do grupo funcional carbonila que sugere ser de um ácido carboxílico, porque em aproximadamente em 3200 cm<sup>-1</sup>

obteve-se uma banda muito larga e de pouca intensidade, correspondente a hidroxila de um ácido.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta um perfil característico de triterpenos para a fração 42 – 48, que foi analisado e identificado como uma mistura de triterpenos.

Pode-se observar a presença de uma ligação dupla trissubstituída pela absorção do hidrogênio olefínico posicionada em aproximadamente 6,1 ppm, que se refere ao  $\text{H}_{24}$  ( $\text{C}_{24}=\text{C}_{25}$ ) presente em ambos triterpenos, porém o sinal em aproximadamente 5,3 ppm, refere-se ao  $\text{H}_7$  de dupla ligação ( $\text{C}_7=\text{C}_8$ ), característico de apenas um dos triterpenos (ácido masticadienónico) presente na mistura. (Tabela 5)

Através do RMN  $^1\text{H}$  foi possível calcular a proporção desses compostos na mistura, que é de 3:1 (67% de ácido isomasticadienónico e 33% de ácido masticadienónico). Espectros em anexos (Anexo 6).

**Tabela 5:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  para a mistura de ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico comparado com dados da literatura.

Próton	metil éster do ácido		ácido	Dados
	isomasticadienónico <sup>17</sup>	masticadienónico <sup>18</sup>		experimentais
	$\text{CDCl}_3$	$\text{C}_6\text{D}_6$	$\text{CDCl}_3$	$\text{CDCl}_3$
<b>7</b>	-	-	5,30	5,3
<b>18</b>	0,77(s)	0,79(s)	0,81(s)	0,759 e 0,791(s)
<b>19</b>	1,11(s)	1,01(s)	1,12(s)	1,118 e 1,1131(s)
<b>21</b>	0,87(s)	0,88(s)	0,89(d)	0,892 e 0,903(s)
<b>24</b>	5,93	5,84	6,09(t)	6,1(t)
<b>27</b>	1,9(s)	1,9(s)	1,92(s)	1,953 e 1,923(s)
<b>28</b>	1,07(s)	0,87(s)	1,01(s)	1,006 e 1,010(s)
<b>29</b>	1,07(s)	1,07(s)	1,01(s)	1,006 e 1,010(s)
<b>30</b>	0,91(s)	0,87(s)	1,05(s)	0,924 e 0,939(s)

Já no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível observar duas carbonilas de cetona da mistura, em aproximadamente 218,0 e 218,5 ppm. Em 173,3 ppm a absorção corresponde a sobreposição dos sinais referentes as carbonilas da função do ácido

carboxílico. Em 147,6 e 126,0 ppm pode-se observar os picos referentes a dupla ligação próxima ao grupo ácido carboxílico. A absorção em 132,8 e 134,8 ppm caracteriza a dupla ligação entre o carbono 8 e 9 do composto 1. Fato este deduzido pela comparação com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do triterpeno ácido 3-epi-isomasticadienónico, que possui um grupo OH ligado ao carbono 3, ao invés de uma carbonila no  $\text{C}_3$ . Já a dupla ligação entre os carbonos 7 e 8 do composto 2 é caracterizada pela absorção em 119,0 e 144,0 ppm. Espectros em anexo (Anexo 6)

Os números de carbonos e os dados encontrados na literatura possibilitaram a identificação e confirmação dos compostos 1 e 2 como sendo os triterpenos ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico respectivamente (Tabela 6).

Esta mistura de triterpenos rendeu 0,3 g em 100 g de extrato hexânico (6,5%).

**Tabela 6:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para a mistura de ácido isomasticadienónico e ácido masticadienónico comparado com dados da literatura.

Carbono	ácido masticadienónico <sup>18</sup> $\text{CDCl}_3$	ácido 3-epi- isomasticadienónico <sup>19</sup> $\text{CDCl}_3$	Dados Experimentais $\text{CDCl}_3$
3	217,1(s)	-	218,0 e 218,5
7	117,8(d)	27,26	28,3 e 119,0
8	145,9(s)	133,30	132,8 e 144,0
9	-	134,33	50,2 e 134,8
24	147,2(d)	147,37	147,6
25	125,8(s)	125,81	126,0
26	173,4(s)	173,12	173,3

Após a recristalização a fração 54 – 55 apresentou-se na forma de cristais brancos e com ponto de fusão de 167 a 177 °C. Seu espectro de infravermelho mostra uma banda de absorção larga em  $3415,11\text{ cm}^{-1}$  que acusa a presença de hidroxila na molécula, a absorção em  $2947,10\text{ cm}^{-1}$  é referente a ligação C-H alifático, já a absorção em  $1689,11\text{ cm}^{-1}$  indica a presença do grupo funcional carbonila que sugere ser de um

ácido carboxílico, porque em aproximadamente em 3200 cm<sup>-1</sup> obteve-se uma banda muito larga e de pouca intensidade, correspondente a hidroxila de um ácido

O espectro de RMN <sup>1</sup>H apresenta um perfil de absorção característico de uma mistura de triterpenos. Observa-se uma banda de absorção de hidrogênio em aproximadamente 3,5 ppm, indicando a presença de um grupo OH no C-3 (Tabela 7). Também se pode observar a presença de uma ligação dupla trissubstituída pela absorção do hidrogênio olefínico posicionada em aproximadamente 6,1 ppm referente ao H<sub>24</sub> (C<sub>24</sub>=C<sub>25</sub>), presente em ambos os triterpenos, porém o sinal em aproximadamente 5,36 ppm, refere-se ao H<sub>7</sub> de dupla ligação (C<sub>7</sub>=C<sub>8</sub>), característico de apenas um dos triterpenos (ácido 3-epi-masticadienólico). Alguns sinais de hidrogênio de metil, embora observados, não foi possível designá-los para cada hidrogênio.

Através do RMN <sup>1</sup>H foi possível calcular a proporção desses compostos na mistura, que é de 4:1 (80% de ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico). Espectros em anexo, (Anexo 7).

Esta mistura de triterpenos rendeu 0,17 g em 100 g de extrato hexânico (3,7%).

**Tabela 7:** Dados de RMN <sup>1</sup>H para a mistura de ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico comparado com dados da literatura.

Próton	ácido 3-epi-isomasticadienólico <sup>19</sup>	ácido 3-epi-masticadienólico <sup>20</sup>	Dados experimentais
	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>	CDCl <sub>3</sub>
<b>3</b>	3,448(t)	3,69	3,5
<b>7</b>	-	5,36	5,3
<b>18</b>	0,778(s)	0,80(s)	0,774 e 0,819
<b>19</b>	0,966(s)	0,87(s)	-
<b>21</b>	0,933(d)	0,97(d)	-
<b>24</b>	6,093(t)	6,06(d)	6,1(t)
<b>27</b>	1,922	2,14(s)	-
<b>28</b>	0,977(s)	1,17(s)	0,973 e 1,1125
<b>29</b>	0,869(s)	0,98(s)	-
<b>30</b>	0,872(s)	1,05(s)	-

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pode-se identificar a carbonila do grupo ácido carboxílico a 172,1 ppm. A ligação dupla trissubstituída é observada pelos sinais em 118,0 e 147,0 ppm, entre os carbonos 7 e 8 ( $\text{C}_7=\text{C}_8$ ) e uma dupla ligação tetrassubstituída, entre os carbonos 8 e 9, que pode ser deduzida a partir dos sinais em 133,4 e 134,5 ppm. A presença do grupo OH no C-3 é confirmada pelo sinal em 76,194 ppm. Espectros em anexo, (Anexo 7)

A comparação entre estes dados espectroscópicos com os dados da literatura possibilitou a identificação deste triterpeno como sendo a mistura do ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico.(Tabela 8)

**Tabela 8:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para a mistura de ácido 3-epi-isomasticadienólico e ácido 3-epi-masticadienólico comparado com dados da literatura.

<b>Carbono</b>	<b>ácido 3-epi- isomasticadienólico<sup>19</sup></b>	<b>ácido 3-epi- masticadienólico<sup>20</sup></b>	<b>Dados Experimentais</b>
	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>	<b><math>\text{CDCl}_3</math></b>
<b>3</b>	76,07	73,5	76,194
<b>7</b>	27,26	118,5	27,44 e 118,0
<b>8</b>	133,30	146,5	133,4 e 147,0
<b>9</b>	134,33	49,1	50,2 e 134,5
<b>24</b>	147,37	142,6	146,2
<b>25</b>	125,81	128,6	126,3
<b>26</b>	173,12	170,7	172,1

Finalmente, para total certeza sobre a identidade das amostras, analisou-se através de cromatografia em camada delgada (CCD) em dois distintos sistemas de solventes, as amostras juntamente com os padrões, e apresentaram o mesmo valor de  $R_f$  de seus padrões.

## 6.CONCLUSÃO

A aplicação de técnicas de separação e identificação de metabólitos secundários ao extrato hexânico de folhas e galhos de *Schinus molle*, permitiu o isolamento e identificação de duas misturas de quatro compostos: 1) mistura do ácido isomasticadienónico com o ácido masticadienónico e 2) a mistura do ácido 3-epi-isomasticadienólico com o ácido 3-epi-masticadienólico.

Os compostos tiveram suas estruturas propostas a partir de dados espectroscópicos, tais como IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , e por comparação com dados da literatura.

Estes resultados e o isolamento destes triterpenos serão utilizados para posterior modificação estrutural em trabalhos futuros.

## 7.BIBLIOGRAFIA

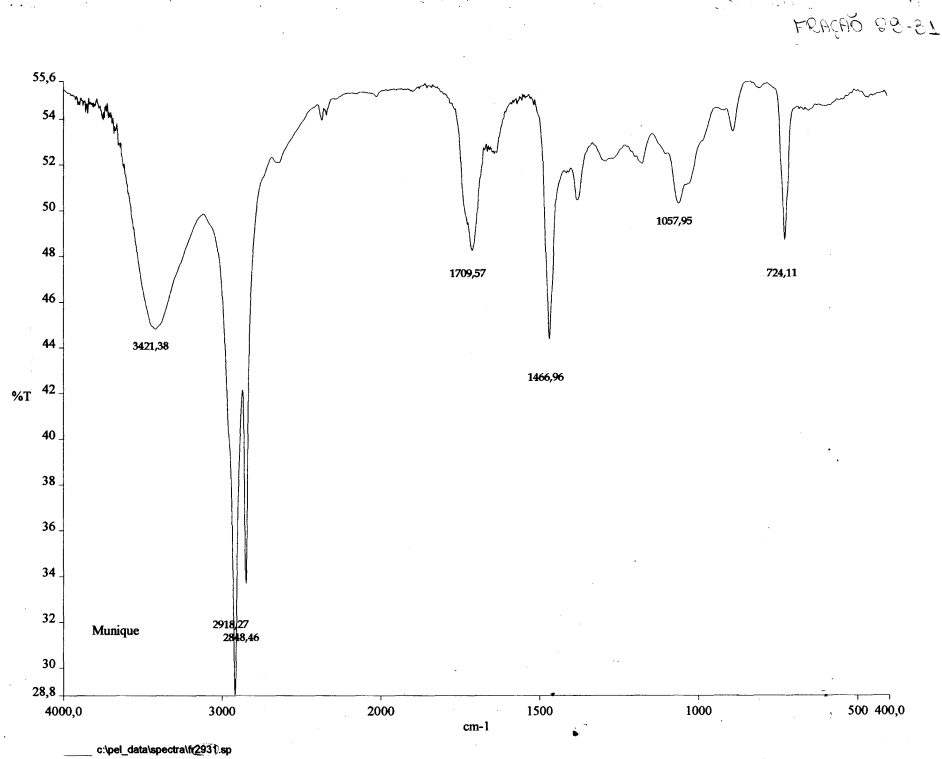
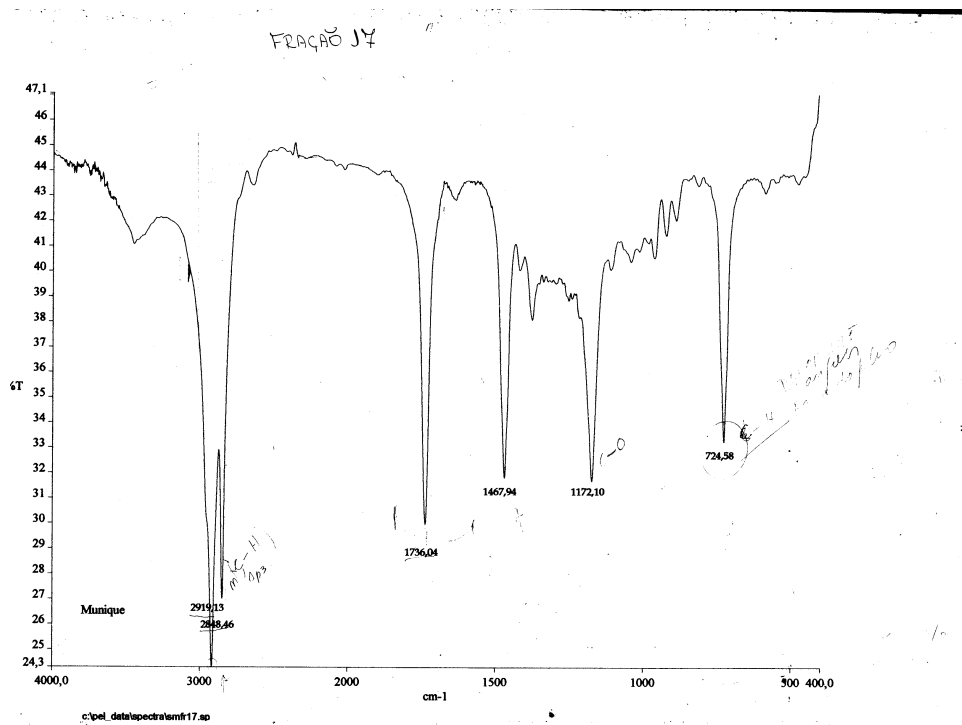
- 1.Hostettmann, K., Queiroz, F. E., Vieira, C. P., **Princípios Ativos de Plantas Superiores**, São Carlos: EdUFSCar, 2003. (Séries de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV).
- 2.Filho, C., V., Yunes, R., A., **Estratégias para Obtenção de Compostos Farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**, Química Nova, Vol.21, No.1, 99-105, 1998.
- 3.Yunes, R., A., Calixto, J., B., **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos. 2001.
- 4.Simões, C.M.O., Schekel, E.P., Gosman, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.
- 5.Maciél, M., A., M., Pinto, A., C., Veiga Jr, V., F., **Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares**, Química Nova, Vol.25, No.3, 429-438, 2002.
- 6.Filho, R., B., **Química de Produtos Naturais: Importância, Interdisciplinaridade, Dificuldades e Perspectivas. A peregrinação de um pacatubano**, Química Nova, Vol.17, No. 5, 405-445, 1994.
- 7.Matos, F., J., A., **Introdução a Fitoquímica Experimental**, Fortaleza Edições UFC 1998.
- 8.Niero, R., **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. 1ª.ed. Editora do Vale do Itajaí: UNIVALI, 2003.
- 9.Queiroz, S., N., Collins, C., H., Jardim, C., S., F., **Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica**, Química Nova, Vol.24, No.1, 68-76, 2001.
- 10.Gros, E., G., Pomilio, A., B., Seldes, A., M., Burton, G., **Introduccion al Estudio de los Productos Naturales**, Ed. Eva V. Chesneau, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires – Buenos Aires, Argentina, 1985.
- 11.Skoog, D.A., **Principles of Instrumental Analysis**, 4th ed., 1992.
- 12.Ewing, G.W., **Métodos Instrumentais de Análise Química, Volume II**, Ed. Edgard Blücher LTDA, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.
- 13.Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 4ª ed. revisada e ampl., Ed. da Unicamp, Campinas, 1990.

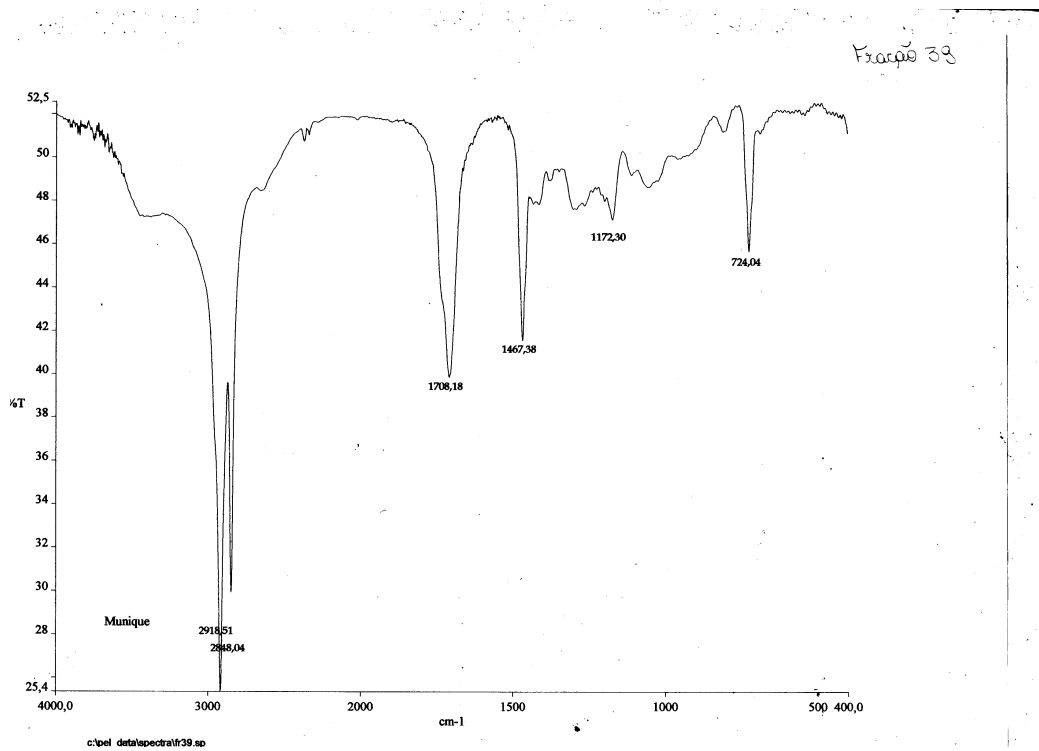
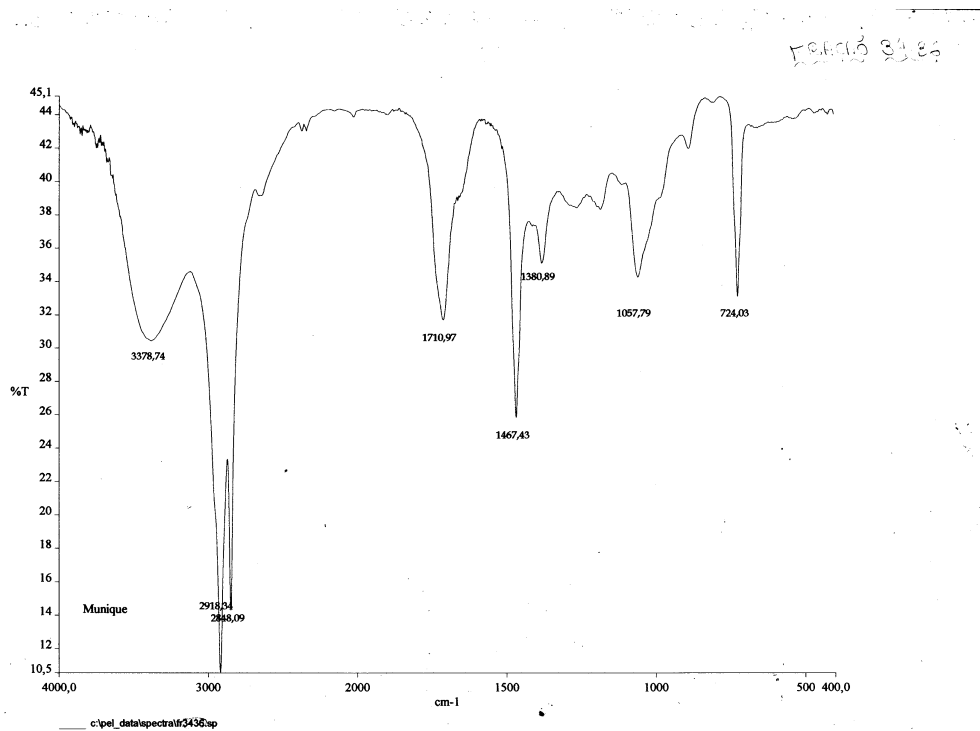
- 14.Choze, R., **Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas**, Florianópolis, 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (em química) Universidade Federal de Santa Catarina.
- 15.Ugaz, O. L., **Investigación Fitoquímica - Métodos en el Estudio de Productos Naturales**, 1a ed., Ed. Fondo editorial, Peru, 1988.
- 16.Silverstein, M.R., Webster, F. X., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6a edição, Ed. Guanabara, 2001.
- 17.Balbi, T.,P., Nobile, L., Scapani, G., Cini, M., **The Triterpenoid acids of *Schinus molle***, Phytochemistry. Vol.17, 2107-2110, 1978.
- 18.Mulholland, D., A., Mair, J., J.,**Triterpenoides from *Dysoxylum pettigrewianum***. Phytochemistry. Vol.32, No.5, 1409-1411, 1994.
- 19.Olafsson, K., Jaroszewski, J., W., Smitt, U., W., Nyman, U., **Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenos from *Schinus molle***. Planta Médica, Vol.63, 352-355, 1997.
- 20.Makino, M., Motegi, T., Fujimoto, Y., **Tirucallane-type triterpenos from *Juliania adstringens***, Phytochemistry, Vol. 65, Issue 7, 891-896, April 2004.



## **ANEXOS**

## ANEXOS 1 - 5



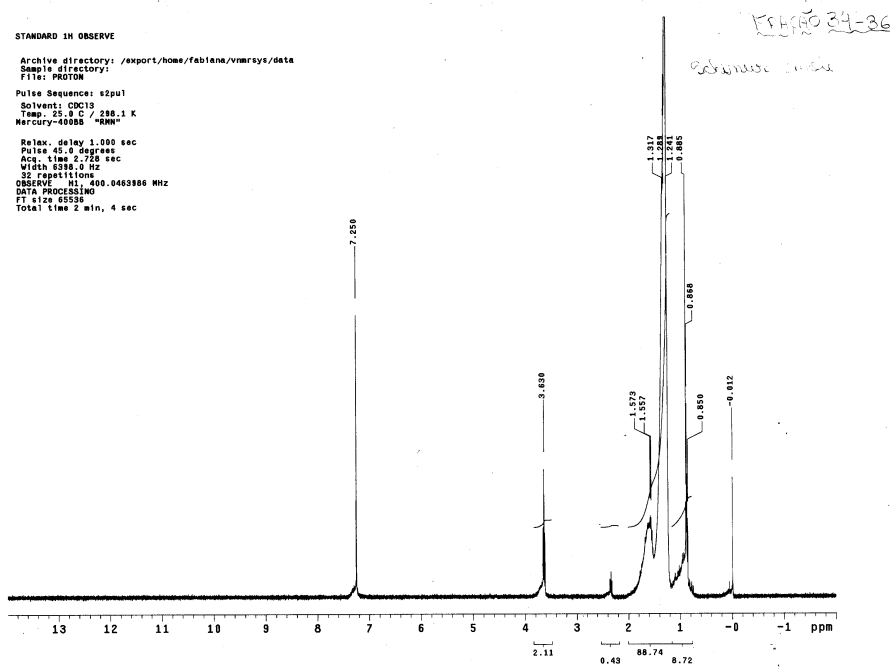


## STANDARD IN OBSERVE

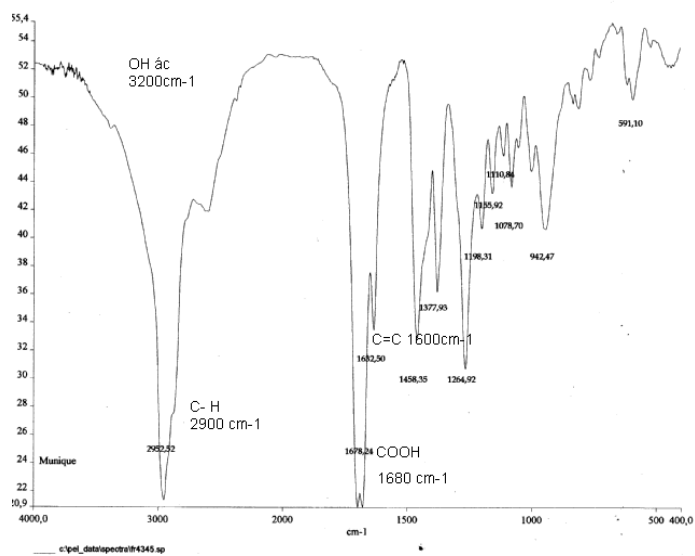
Archive directory: /export/home/fabiana/vnmrsys/data  
Sample directory:  
File: PROTON

Pulse Sequence: zgpg30  
Solvent: CDCl3  
Temp: 25.0 C / 298.1 K  
Mercury-400MS "gpc"

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degree  
Acq. time 0.720 sec  
Width 8588.0 Hz  
32 repetitions  
OBSERVE: H1, 400.0463906 MHz  
DATA PROCESSING  
F1 size 65536  
Total time 2 min, 4 sec



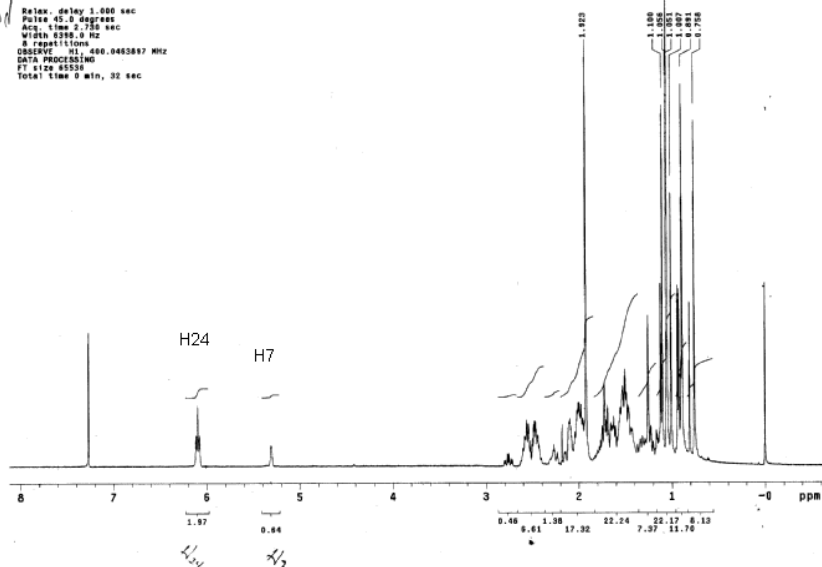
## Anexos 6



FRACAO 42

```
Pulse Sequence: szpul
Solvent: CDC13
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Mercury-450SB "RNM"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.750 sec
Width 6258.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.0463897 MHz
DATA PROCESSING
FT size 45530
Total time 0 min, 32 sec
```

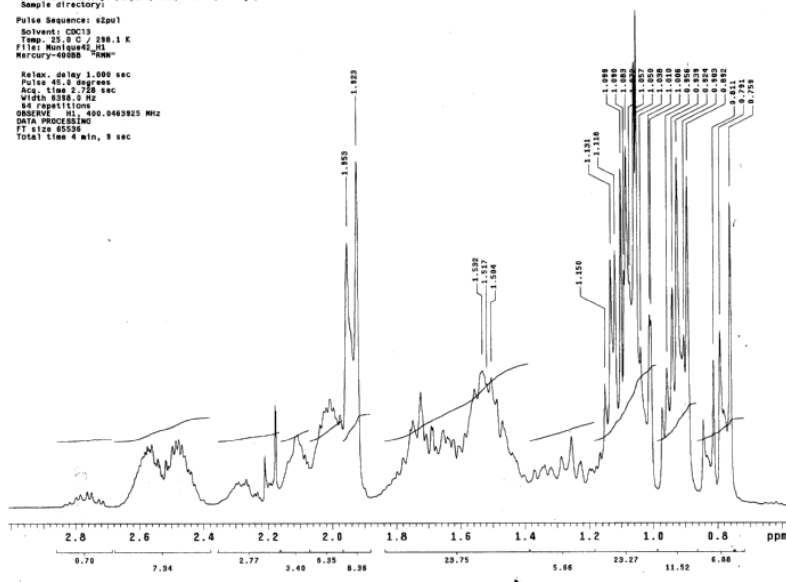


క్రమం 42

STANDARD 1H OBSERVE

```
Archive directory: /export/home/fabiana/vmr/sys/data
Sample directory:
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
File: Munique42_H1
Mercury-400SB "RNM"
```

```
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.728 sec
Width 6388.0 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1: 400.0463925 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 4 min. 8 sec
```





Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 1.280 sec  
Wideth 25355.9 Hz  
11248 Repetitions  
SOLVENT C13, 100-517218 MHz  
DECOUPLE H1, 400-048482 MHz  
Low power 1023 dB atten.  
continuously on  
MAGT-2 is modulated  
DATA PROCESSING:  
1 line broadening 3.0 Hz  
1 line 0.0028  
Total time 15 hr, 17 min, 57 sec

C9  
C26  
C24  
C8  
C25  
C7

218.554  
173.380  
147.402  
133.686  
133.611  
130.081  
120.081

77.572  
77.513  
77.454  
76.941  
53.917  
53.858  
51.672  
48.084  
48.084  
45.247  
39.747  
38.275  
38.275  
36.961  
35.778  
35.778  
35.176  
34.259  
34.259  
33.953  
33.953  
28.278  
27.881  
27.881  
24.761  
24.451  
22.403  
21.648  
21.648  
18.768  
18.472  
15.453  
15.761

0.49 3.79 4.67 3.29 2.25 1.68 0.68 35.82 10.85 10.46 13.14 10.04 6.11 1.89

Mercury-6000S

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 1.200 sec  
Width 2500.1 Hz  
2140 resolution  
OBSERVE 141.1805817010 MHz  
DECOUPLE 40.4005004802 MHz  
Low power 103 dB atten.  
continuity on  
MILTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 3.0 Hz  
F7 size 0100

Total time 15 hr, 17 min, 57 sec

17.00

15 50 45 40 35 30 25 20 15 ppm

13.033

15.763

16.455

16.700

16.715

16.722

16.727

16.736

16.746

16.756

16.764

16.772

16.787

16.791

16.805

16.816

16.828

16.835

16.840

16.851

16.858

16.868

16.878

16.883

16.888

16.893

16.898

16.903

16.908

16.913

16.918

16.923

16.928

16.933

16.938

16.943

16.948

16.953

16.958

16.963

16.968

16.973

16.978

16.983

16.988

16.993

16.998

17.003

17.008

17.013

17.018

17.023

17.028

17.033

17.038

17.043

17.048

17.053

17.058

17.063

17.068

17.073

17.078

17.083

17.088

17.093

17.098

17.103

17.108

17.113

17.118

17.123

17.128

17.133

17.138

17.143

17.148

17.153

17.158

17.163

17.168

17.173

17.178

17.183

17.188

17.193

17.198

17.203

17.208

17.213

17.218

17.223

17.228

17.233

17.238

17.243

17.248

17.253

17.258

17.263

17.268

17.273

17.278

17.283

17.288

17.293

17.298

17.303

17.308

17.313

17.318

17.323

17.328

17.333

17.338

17.343

17.348

17.353

17.358

17.363

17.368

17.373

17.378

17.383

17.388

17.393

17.398

17.403

17.408

17.413

17.418

17.423

17.428

17.433

17.438

17.443

17.448

17.453

17.458

17.463

17.468

17.473

17.478

17.483

17.488

17.493

17.498

17.503

17.508

17.513

17.518

17.523

17.528

17.533

17.538

17.543

17.548

17.553

17.558

17.563

17.568

17.573

17.578

17.583

17.588

17.593

17.598

17.603

17.608

17.613

17.618

17.623

17.628

17.633

17.638

17.643

17.648

17.653

17.658

17.663

17.668

17.673

17.678

17.683

17.688

17.693

17.698

17.703

17.708

17.713

17.718

17.723

17.728

17.733

17.738

17.743

17.748

17.753

17.758

17.763

17.768

17.773

17.778

17.783

17.788

17.793

17.798

17.803

17.808

17.813

17.818

17.823

17.828

17.833

17.838

17.843

17.848

17.853

17.858

17.863

17.868

17.873

17.878

17.883

17.888

17.893

17.898

17.903

17.908

17.913

17.918

17.923

17.928

17.933

17.938

17.943

17.948

17.953

17.958

17.963

17.968

17.973

17.978

17.983

17.988

17.993

17.998

18.003

18.008

18.013

18.018

18.023

18.028

18.033

18.038

18.043

18.048

18.053

18.058

18.063

18.068

18.073

18.078

18.083

18.088

18.093

18.098

18.103

18.108

18.113

18.118

18.123

18.128

18.133

18.138

18.143

18.148

18.153

18.158

18.163

18.168

18.173

18.178

18.183

18.188

18.193

18.198

18.203

18.208

18.213

18.218

18.223

18.228

18.233

18.238

18.243

18.248

18.253

18.258

18.263

18.268

18.273

18.278

18.283

18.288

18.293

18.298

18.303

18.308

18.313

18.318

18.323

18.328

18.333

18.338

18.343

18.348

18.353

18.358

18.363

18.368

18.373

18.378

18.383

18.388

18.393

18.398

18.403

18.408

18.413

18.418

18.423

18.428

18.433

18.438

18.443

18.448

18.453

18.458

18.463

18.468

18.473

18.478

18.483

18.488

18.493

18.498

18.503

18.508

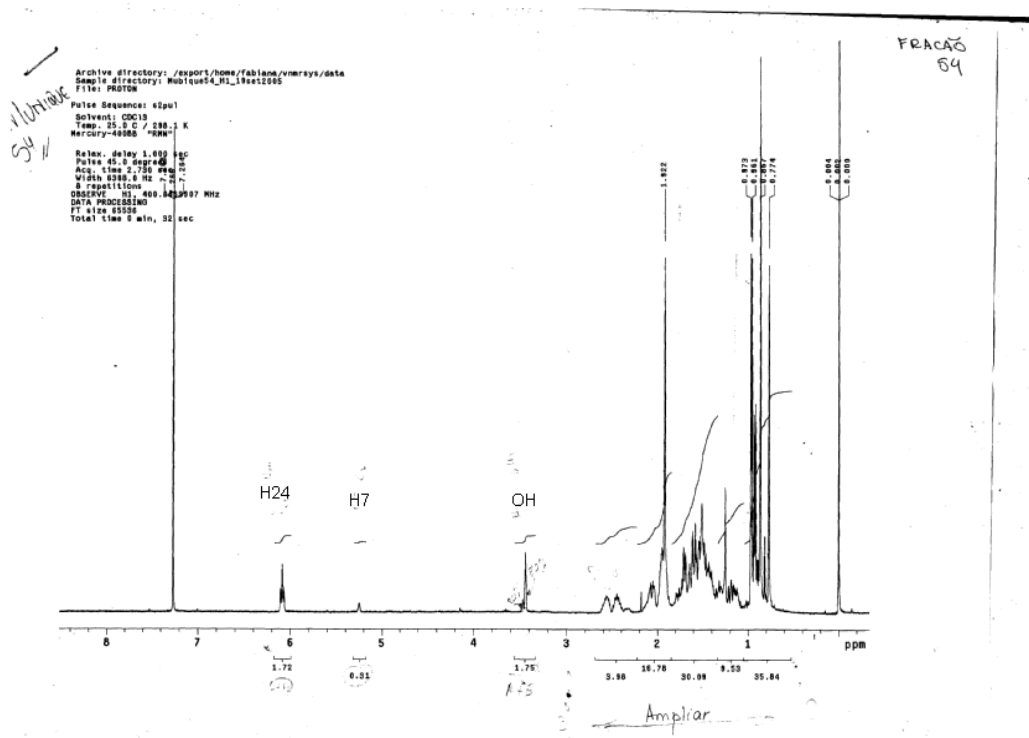
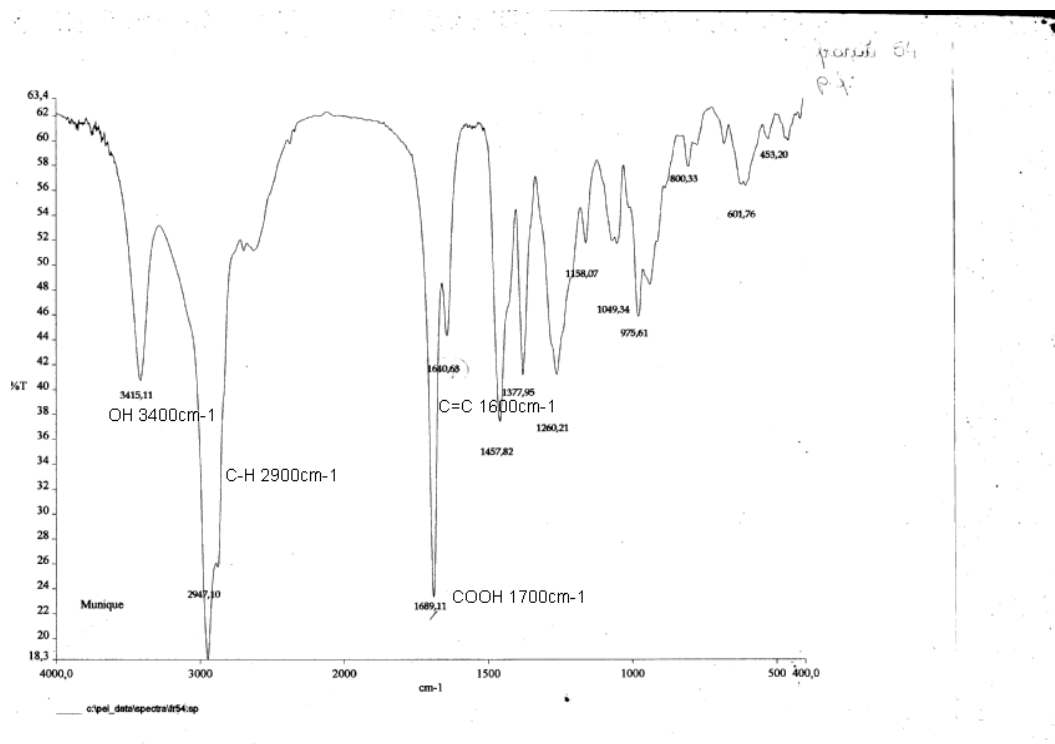
18.513

18.518

18.523

<

## ANEXOS 7



Munique  
 Frédo 54  
 C13 CDC13  
 Archive directory: /export/home/fabiane/rnmr/sys/data  
 Sample directory:  
 Pulse Sequence: szpul

